

# 生理的内圧存在下の犬冠微小血管における，チトクロームP450代謝産物・一酸化窒素・プロスタサイクリン・過酸化水素のアセチルコリンによる過分極反応への関与の検討

著者	田中 光昭
号	1837
発行年	2002
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/22280">http://hdl.handle.net/10097/22280</a>

氏 名（本籍）	たなかみつあき 田 中 光 昭
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 8 3 7 号
学位授与年月日	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	<p>Cytochrome P450 metabolites but not nitric oxide, prostacyclin and hydrogen peroxide contribute to acetylcholine-induced hyperpolarization of pressurized canine coronary microvessels</p> <p>（生理的内圧存在下の犬冠微小血管における，チトクロームP450代謝産物・一酸化窒素・プロスタサイクリン・過酸化水素のアセチルコリンによる過分極反応への関与の検討）</p>
	（主 査）
論 文 審 査 委 員	教授 白 土 邦 男      教授 仁 田 新 一
	教授 柳 澤 輝 行

# 論文内容要旨

## 研究目的

微小循環では、内皮由来過分極因子 (EDHF) や ATP 感受性 K チャネルなど、K チャネルを介した平滑筋膜電位調節機構が、血管トーンスの調節に重要な役割を果たしている。この機構は一酸化窒素 (NO)・プロスタサイクリン ( $\text{PGI}_2$ )・EDHF では、血管壁応力で影響されると報告されているが、内皮依存性過分極反応に関する多くの実験では、摘出血管を切り開いて検討しており、生理的内圧下での報告は少ない。そこで生理的内圧下で、平滑筋膜電位を計測する蛍光法を開発し、アセチルコリン (ACh) による過分極反応に、NO・ $\text{PGI}_2$  や EDHF の候補物質であるチトクローム P 450 代謝産物や過酸化水素が関与しているか否か検討した。

## 研究方法

イヌ摘出冠微小動脈の一端をピペットに固定し、他端は結紮して盲端とし、血管内圧を 60 cm  $\text{H}_2\text{O}$  に保った。これを容積 0.5 ml の実験槽に納め、槽内を膜電位感受性蛍光色素 (bis-oxonol;  $0.25 \mu\text{M}$ ) を含んだ生理食塩液で灌流した。実験後、NIH image ソフトで蛍光輝度と血管内径を同時測定した。実験 1: Gramicidin ( $1 \mu\text{M}$ ; カチオンイオノフォア) を用い、浸透圧一定で  $\text{Na}^+$  濃度を 3 段階にかえた灌流液で血管平滑筋の膜電位を  $-69 \cdot -40 \cdot -8 \text{ mV}$  に設定し、蛍光輝度を測定した。実験 2: 生理的内圧存在下での ACh ( $0.1\text{-}10 \mu\text{M}$ ) による過分極反応を、① 阻害剤非存在下、② L-NNA ( $100 \mu\text{M}$ ; NO 合成酵素阻害剤) + indomethacin ( $10 \mu\text{M}$ ; IND: シクロオキシゲナーゼ阻害剤) 存在下、③ L-NNA + IND + 17-ODYA ( $5 \mu\text{M}$ ; チトクローム P 450 阻害剤) 存在下、④ L-NNA + IND + catalase ( $1250 \text{ Uml}^{-1}$ ; 過酸化水素の分解反応を触媒するたんぱく) 存在下、の 4 群で検討した。

## 研究結果

血管平滑筋膜電位と蛍光輝度変化率は直線関係を示した。阻害剤非存在下で ACh を投与すると、平滑筋膜電位の蛍光輝度は有意に減少した。この ACh による蛍光輝度減少は、L-NNA と IND の併用投与の影響を受けなかった。ACh による蛍光輝度減少は、L-NNA と IND に 17-ODYA を併用投与すると有意に減弱したが、catalase を併用投与しても阻害されなかった。

## 結論

本法では膜電位と蛍光輝度変化率は直線関係を示し、ACh による過分極反応が解析可能であっ

た。生理的内圧存在下のイヌ冠微小動脈において、チトクローム P 450 代謝産物は ACh による過分極反応に関与しているが、NO・PGI<sub>2</sub>・過酸化水素は関与していないことが示唆された。

### 研究の意義・独創的な点

本研究では蛍光色素を用いて、より生理的な状態で血管に傷害を与えずに膜電位変化を測定でき、膜電位変化と内径変化を同時に測定できるという点で、非常に独創的な手法を開発した。血管内皮は、NO-cGMP 系、PGI<sub>2</sub>-cAMP 系、および膜電位変化を介して血管トーンスを調節しているが、この 3 つは疾患モデルでは、1 つの系が障害されると他の系が相補的に働くことが最近報告されている。しかしながら、膜電位の過分極を引き起こす物質はまだ同定されていない。本研究は、生理的内圧下の犬冠微小動脈における内皮依存性過分極反応に、従来から言われていた NO・PGI<sub>2</sub> や、最近提唱された過酸化水素は関与しておらず、チトクローム P 450 代謝産物が関与していることを示した。これは、血管のトーンス調節の生理を理解する上で基礎的なデータであり、今後疾患モデルにおける過分極反応の役割を検討する上で、重要な意義を持つと考える。

## 審 査 結 果 の 要 旨

微小循環では、内皮由来過分極因子 (EDHF) や ATP 感受性 K チャネルなど、K チャネルを介した平滑筋膜電位調節機構が、血管トーンスの調節に重要な役割を果たしている。さらに一酸化窒素 (NO)、プロスタサイクリン ( $\text{PGI}_2$ ) も K チャネルを介した平滑筋膜電位調節への関与が考えられており、太い血管では NO,  $\text{PGI}_2$ , EDHF の過分極作用は壁応力で影響されると報告されている。しかし内皮依存性過分極反応に関する多くの実験は、摘出血管を切り開いて検討しており、生理的内圧下での報告は少ない。本研究では、生理的内圧存在下で平滑筋膜電位を計測する蛍光法を開発し、これを用いてアセチルコリン (ACh) による冠微小血管の過分極反応に、NO,  $\text{PGI}_2$ , EDHF の候補物質であるチトクローム P 450 代謝産物、過酸化水素が関与するか否かを検討している。

研究内容は以下の 3 つに分けられる。1) 膜電位感受性蛍光色素を用いて、血管内圧の存在下で膜電位変化を評価できる新しい手法を開発した。この手法は、膜電位だけでなく血管内径変化も同時に測定でき、より生理的な条件下での両者の同時測定を可能とした。2) 生理的内圧が加えられた場合でも、イヌ冠微小動脈では NO,  $\text{PGI}_2$  は ACh による過分極反応に関与しないことを明らかにした。3) EDHF を介した反応は、過酸化水素ではなくチトクローム P 450 代謝産物によることを明らかにした。

本研究で開発された蛍光色素による血管壁の膜電位計測法は、より生理的な状態で電極の刺入などの傷害を与えずに膜電位変化を測定でき、かつ膜電位変化と内径変化を同時に測定できるという点で、非常に独創的で優れた方法である。血管内皮は、代表的な機構として NO-cGMP 系、 $\text{PGI}_2$ -cAMP 系、および膜電位変化を介して血管トーンスを調節しており、近年これらは 1 つの系が障害されると他の系が相補的に働くと考えられているが、本研究で得られた知見は、正常な状態の冠微小血管では内皮依存性過分極反応に、従来関与しうると考えられていた NO,  $\text{PGI}_2$  は介在せず、膜電位の過分極を引き起こす物質は最近提唱された過酸化水素ではなく、チトクローム P 450 代謝産物であることを示した。これは、血管のトーンス調節の生理的機構を理解する上で重要な基礎的データであり、生理的な過分極反応機構を検討する上で重要である。本研究は独創的であり、その結果は冠循環の生理的・病態生理的調節機構の解明に重要な意義を持つ。よって本研究は学位論文に値する。